

学 位 論 文 題 名

Activation of WD Repeat and High-Mobility Group Box DNA Binding Protein 1 in Pulmonary and Esophageal Carcinogenesis

(肺癌・食道癌の進行に関わる癌抗原 WDHD1の解析)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

肺癌は本邦の悪性腫瘍による死亡数の第 1 位を占め、食道扁平上皮癌は消化管悪性腫瘍の中で最も悪性度の高い癌腫の一つである。これらに対しては、外科的治療、放射線化学療法による集学的治療が行われているが、未だ十分な治療成績が得られず、より有効な治療法、診断法の開発が必要である。そこで我々は肺癌、食道癌において、高頻度、高レベルに発現が上昇している新規遺伝子を同定し、その機能解析により新規治療法につながる分子標的を見出すことを本研究の目的とした。新規分子標的抽出のため、我々は 27,648 遺伝子をカバーする cDNA マイクロアレイを利用して肺癌、食道癌の網羅的遺伝子発現情報解析を行い、肺癌および食道癌組織において高頻度、高レベルに発現上昇している遺伝子を抽出した。さらに、siRNA を用いた遺伝子発現阻害実験とともに、肺癌、食道癌組織アレイを用いた免疫組織学的検討を行い、新規診断マーカー、治療薬開発に向けた標的遺伝子抽出のための high-throughput screening を行った。その結果、正常臓器組織では精巣においてのみ発現し、癌発生に重要な働きをしていると考えられる WD Repeat and High-Mobility Group Box DNA Binding Protein 1 (WDHD1) を同定した。

WDHD1 は酵母 Ctf4 のヒトにおける homologue として同定された遺伝子である。これまでにヒトの癌での報告はなされておらず、癌悪性化との関連は未知の分子である。そこで今回我々は、WDHD1 の予後診断マーカーとしての有用性と、新規治療法開発のための機能解析を行った。

【対象と方法】

肺癌、食道癌組織試料：北海道大学病院腫瘍外科およびその関連病院においてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者 267 症例から切除された癌組織とそれぞれの症例に対応した非癌部組織、また北海道大学病院腫瘍外科および恵佑会札幌病院において食道癌患者 283 症例から切除された癌組織とそれぞれの症例に対応した非癌部組織を対象として、免疫組織学的検討を行った。同様にインフォームドコンセントの得られた肺癌、食道癌患者由来の試料を用いて total RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR を行った。

免疫組織学的検討：抗体は市販の anti-WDHD1 ウサギポリクローナル抗体(ATLAS)を用いた。肺癌、食道癌組織アレイの判定は 3 名の臨床情報未知の医師の判定により行い、生存分析では Stat View statistical program(SaS)により log rank test を用いて p value 0.05 以下を有意差ありと判定した。

【結果】

マイクロアレイデータより解析候補分子として抽出した WDHD1 は正常肺、正常食道で発現を認めず、癌組織において mRNA および蛋白レベルで強く発現している分子であることが、肺癌、食道癌臨床検体を用いた半定量的 RT-PCR、Western blotting により示された。

Multiple tissue northern 法により、正常臓器においては精巣にのみ発現しており、癌精巣抗原である可能性が示唆された。

肺癌細胞株 A549、食道癌細胞株 TE9 を用いた siRNA による発現阻害実験において、WDHD1 の発現抑制による細胞増殖抑制効果を認めた。さらにこの発現抑制による細胞周期に与える影響について flow cytometry、Time lapse 顕微鏡を用いて検討を行った。flow cytometry を用いた経時的な解析では、S 期への移行および S 期進行の遅延を認め、Time lapse 顕微鏡を用いた観察では、細胞分裂の遅延と、細胞分裂直後に細胞死に至る様子が観察された。

約 550 例の非小細胞肺癌、食道癌組織マイクロアレイによる免疫組織学的検討では、WDHD1 は非小細胞肺癌、食道癌組織において高頻度に発現しており、さらにこの蛋白を強く発現する症例の予後は有意に不良であることが示された。

以上より、この分子が肺癌、食道癌細胞の悪性化に関与し、かつ有望な治療標的であると考えられた。

そこで、WDHD1 の癌悪性化に関わる機構としてリン酸化修飾に着目して検討を行った。WDHD1 のアミノ酸配列から、AKT によるリン酸化修飾が予測された。AKT によるリン酸化修飾を特異的に認識する抗体を用いた免疫沈降による検討、in vitro kinase assay による検討により、WDHD1 は AKT1 によってリン酸化修飾を受けることが示された。さらに、PI3K/AKT pathway の阻害剤である LY294002、および AKT1 に特異的な siRNA を用いた検討により、AKT1 によるリン酸化修飾は WDHD1 の蛋白安定化に関与していると考えられた。

【考察】

我々は新規診断マーカー、新規分子標的治療薬開発のためのマイクロアレイシステムを用いて、網羅的遺伝子・蛋白発現情報解析を行うことにより、癌特異的に発現上昇を認め、正常臓器では精巣にのみ発現を認める WDHD1 を同定した。

WDHD1 は、酵母 Ctf4 のヒトにおける homologue として同定された遺伝子である。Ctf4 については、DNA polymerase α と相互作用して姉妹染色分体接着に関与することや、DNA 合成に影響を及ぼして、生存能力、染色体恒常性維持、テロメア複製に関与することが報告されている。また、WDHD1 は、Mcm10 と相互作用して、DNA polymerase α の複製開始領域へのローディング、DNA 複製開始に関与することが報告されている。しかしながら、これまでに癌での報告はなされておらず、癌悪性化との関連は未知の分子である。

本研究では、組織アレイを用いた検討により、非小細胞肺癌、食道癌患者の予後と有意な相関を認めた。一過性発現系、および siRNA を用いた検討により、細胞増殖との関連を認めた。siRNA による発現抑制により、S 期への移行および S 期の進行の遅延を認め、細胞分裂直後に細胞死に至ることが示された。これらのことから、WDHD1 の発現上昇がヒトの癌悪性化に重要な役割を示すことが類推された。

一方で、WDHD1 が PI3K/AKT pathway の下流に位置する分子であることが見出された。PI3K/AKT pathway は癌細胞の増殖・生存に関与する経路で、AKT1 によるリン酸化は種々の癌腫において広く認められ、早期再発や予後不良に関与することが知られている。本研究では、AKT1 による WDHD1 のリン酸化が示され、また AKT1 のによるリン酸化が WDHD1 の蛋白安定化に寄与していると考えられた。これらのことから、AKT1 による WDHD1 リン酸化の選択的阻害が治療標的となる可能性が示唆された。

【結論】 WDHD1 は精巣以外の正常臓器では発現しておらず、肺癌、食道癌で高頻度、高レベルの発現を示す分子で、癌細胞の増殖、生存に極めて重要な分子であると考えられた。新規分子標的薬の治療候補、および予後予測バイオマーカーへの応用の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Activation of WD Repeat and High-Mobility Group Box DNA Binding Protein 1 in Pulmonary and Esophageal Carcinogenesis

(肺癌・食道癌の進行に関わる癌抗原 WDHD1の解析)

肺癌・食道癌は予後不良な癌腫であり、集学的治療が行われているが、未だ十分な治療成績が得られず、より有効な治療法、診断法の開発が必要である。そこで、肺癌、食道癌において、高頻度、高レベルに発現が上昇している新規遺伝子を同定し、その機能解析により新規治療法につながる分子標的を見出すことを目的に一連の研究を行った。新規分子標的抽出のため、cDNA マイクロアレイを利用して肺癌、食道癌の網羅的遺伝子発現情報解析を行い、肺癌および食道癌組織において高頻度、高レベルに発現上昇している遺伝子を抽出した。さらに、siRNA を用いた遺伝子発現阻害実験とともに、肺癌、食道癌組織マイクロアレイを用いた免疫組織学的検討を行い、新規診断マーカー、治療薬開発に向けた標的遺伝子抽出のための high-throughput screening を行った。その結果、正常臓器組織では精巣においてのみ発現し、癌発生に重要な働きをしていると考えられる WD Repeat and High-Mobility Group Box DNA Binding Protein 1 (WDHD1) を同定した。WDHD1 は酵母 Ctf4 のヒトにおける homologue として同定された遺伝子である。これまでにヒトの癌での報告はなされておらず、癌悪性化との関連は未知の分子である。そこで本研究では、WDHD1 の予後診断マーカーとしての有用性の検討と新規治療法開発のための機能解析を行った。

WDHD1 は正常肺、正常食道で発現を認めず、癌組織において mRNA および蛋白レベルで強く発現している分子であることが、肺癌、食道癌臨床検体を用いた半定量的 RT-PCR、Western blotting により示された。Multiple tissue northern 法により、正常臓器においては精巣にのみ発現しており、癌精巣抗原である可能性が示唆された。

ヒト肺腺がん細胞株 A549、ヒト食道がん細胞株 TE9 を用いた siRNA による発現阻害実験において、WDHD1 の発現抑制による細胞増殖抑制効果を認めた。さらにこの発現抑制による細胞周期に与える影響について flow cytometry、Time lapse 顕微鏡を用いて検討を行った。Flow cytometry を用いた経時的な解析では、S 期への移行および S 期進行の遅延を認め、Time lapse 顕微鏡を用いた観察では、細胞分裂の遅延と、細胞分裂直後に細胞死に至る様子が観察された。

約 550 例の非小細胞肺癌、食道癌組織マイクロアレイによる免疫組織学的検討では、WDHD1 は非小細胞肺癌、食道癌組織において高頻度に発現しており、さらにこの蛋白を強く発現する症例の予後は有意に不良であることが示された。

以上より、この分子が肺癌、食道癌細胞の悪性化に関与し、かつ有望な治療標的であると考えられた。

そこで、WDHD1 の癌悪性化に関わる機構としてリン酸化修飾に着目して検討を行った。WDHD1 のアミノ酸配列から、AKT によるリン酸化修飾が予測された。AKT によるリン酸化修飾を特異的に認識する抗体を用いた免疫沈降による検討、in vitro kinase assay による検討により、WDHD1 は AKT1 によってリン酸化修飾を受けることが示された。さらに、PI3K/AKT pathway の阻害剤である LY294002、および AKT1 に特異的な siRNA を用いた検討により、AKT1 によるリン酸化修飾は WDHD1 の蛋白安定化に関与していると考えられた。

本研究により、癌精巣抗原の可能性が示唆される WDHD1 の同定、WDHD1 の発現が肺癌・食道癌患者の予後と関連があること、WDHD1 の発現が細胞増殖に対して促進的に作用すること、WDHD1 が PI3K/AKT pathway の下流の分子であることが見出され、この分子が治療標的、予後マーカーとして有用である可能性が示唆された。

口頭発表に続き、副査秋田弘俊教授より、組織マイクロアレイの結果について臨床病理学的因子との関連、他癌腫での発現状況、WDHD1 の考えられる機能について、副査近藤哲教授より、cDNA マイクロアレイの結果で解析候補となった遺伝子数、候補遺伝子の中から WDHD1 に着目した理由、今後の臨床への応用の可能性、血中への分泌の有無について、主査今村雅寛教授より、正常臓器での発現、細胞周期のどの過程に作用し得るか、ワクチン療法・抗体療法の可能性についての質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。